



TITLE:

Radioimmunoassay用3社kitによる 前立腺性酸性フォスファターゼの 臨床的検討

AUTHOR(S):

塚本, 泰司; 熊本, 悦明; 梅原, 次男; 黒畑, 敏江

CITATION:

塚本, 泰司 ...[et al]. Radioimmunoassay用3社kitによる前立腺性酸性フォスファターゼの臨床的検討. 泌尿器科紀要 1982, 28(1): 13-36

ISSUE DATE:

1982-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/123023>

RIGHT:

Radioimmunoassay 用3社 kit による前立腺性酸性 フォスファターゼの臨床的検討

札幌医科大学泌尿器科学教室 (主任：熊本悦明教授)

塚	本	泰	司
熊	本	悦	明
梅	原	次	男
黒	畑	敏	江

CLINICAL INVESTIGATIONS OF PROSTATIC ACID PHOSPHATASE WITH THREE RADIOIMMUNOASSAY KITS

Taiji TSUKAMOTO, Yoshiaki KUMAMOTO,
Tsuguo UMEHARA and Toshie KUOHATA

From the Department of Urology, Sapporo Medical College

The enzyme assay for acid phosphatase and even for L-tartrate labile acid phosphatase is not specific for that of the prostate origin. The radioimmunoassay has recently been developed to detect the enzyme more specific to the prostate. We carried out the investigations of the fundamental characters and clinical usefulness in three commercial kits (Eiken's kit, Clinical Assays' kit and Mallinckrodt's kit). The results were as followed.

1) The reproducibility of their standard curves using three kits showed the satisfactory results with the straight lines in them. Coefficients of variation within assay was minimum among three kits (2.1%~14.5%). Coefficient *between* assays was also minimum in them (6.2~14.3%). The dilution tests in them were satisfactory. The recovery tests in three kits revealed the recovered rate to be almost 100%. These results in this fundamental study showed that three kits were useful in clinical practice.

2) The correlation in three kits was investigated by the measurement of Eiken's standard sera with Clinical Assays' and Mallinckrodt's kit. This showed the good correlation in each instance. For the further investigation of their correlation, 41 samples which were below 3.0 ng/ml in Eiken's kit, were measured by Clinical Assays' and Mallinckrodt's kit. This, however, did not reveal the good correlation each other. While, comparing the ratio of samples within normal range in three kits, no significant difference was observed. With the same comparison between Eiken's and Clinical Assays' kit, and between Eiken's and Mallinckrodt's kit, these ratios were almost identical in the samples with B.P.H. and non-prostatic diseases. These results have led us to the conclusion that the low degree of correlation in low concentration samples in three kits have not always produced the serious problems in the clinical practice. Of course, the further fundamental investigations will be necessary in the selection of PAP sources and methods of PAP purification, which may be related to the differences of PAP level in three kits.

3) The correlation of PAP level measured by the radioimmunoassay and that by the enzyme assay was good on the whole (Eiken's kit: $r=0.69$, Clinical Assays' kit: $r=0.85$ and Mallinckrodt's kit: $r=0.71$), while this was not true in the low concentration samples.

4) PAP was measured by three kits in 427 samples from normal male and female adults, and those with various urological diseases (190 cases in Eiken's kit, 141 cases in Clinical Assays' kit and 96 cases in Mallinckrodt's kit). The normal values in each kit were determined as below 2.5 ng/ml in Eiken's kit, below 2.0 ng/ml in Clinical Assays' kit and 2.2 ng/ml in Mallinckrodt's kit. From the clinical point of view, PAP level below 2.5 to 3.0 ng/ml may be suitable for the normal value in three kits.

5) Other than the patients with prostatic carcinoma, there were three with B.P.H. whose PAP rose above the normal level in Eiken's kit. In Clinical Assays' kit such patients were observed in two with B.P.H. and one with nonprostatic diseases. There was only one patients with B.P.H. whose PAP rose above the normal level in Mallinckrodt's kit. In prostatic carcinoma, the positive rate of PAP were 28.6%, 37.5% and 84.2% in stage A+B, C and D, respectively in Eiken's kit; 10%, 45.5% and 81.3% in Clinical Assays' kit; 42.9%, 37.5% and 100% in Mallinckrodt's kit. The positive rate of PAP in relation to clinical stage could not be compared each other in three kits because these patients were not identical. Adding up the samples of all the tests the positive rate was 22.6% in stage A+B, 37.1% in C and 85.4% in D. This value of stage A+B seems to be low.

6) The sensitivity and the specificity were 53.3% and 100%, respectively in PAP-RIA. In TAP-Enzyme assay these were 35.5% and 94.9%, respectively, in PAP-Enzyme assay the sensitivity was 48.6% and the specificity 75.9%. These results have led us to the conclusion that the radioimmunoassay for PAP has given more accurate information in clinical practice than the enzyme assay has done. Because of some advantage in the enzyme assay, however, the radioimmunoassay has been required to be further improved in its procedure.

7) The usefulness of radioimmunoassay for PAP in screening the patients with prostatic carcinoma in early stage has not been established. Our results agreed with this opinion. Not only more improvement of radioimmunoassay for PAP but also elucidation of the mechanism of PAP elevation in prostatic carcinoma will be necessary for the establishment of the clinical usefulness of PAP for screening of early prostatic cancer.

Key words : Prostatic acid phosphatase, RIA, Prostatic carcinoma

1939年 Gutman ら¹⁾により、転移性前立腺癌において総酸性フォスファターゼ (以下 TAP と略す) の上昇が明らかにされて以来、前立腺癌の tumor marker としての意義に関しては幾多の報告がある。また前立腺性酸性フォスファターゼ (以下 PAP と略す) の免疫学的特異性に関しても、Shulman ら²⁾、Moncure ら³⁾ の論文や、Prout ら⁴⁾ の詳細な総説があるが、これらの成果をもとにして免疫学的測定法の1つである radioimmunoassay (以下 RIA と略す) による PAP の測定が確立され臨床応用されるようになってきている。現在までに RIA による PAP の測定の報告は、Foti ら⁵⁾、Belville ら⁶⁾、Griffiths⁷⁾、Choe ら⁸⁾、Vihko ら⁹⁾ によってなされており本邦でも最近報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾。また Lee ら¹⁵⁾ による fluorescent immunoassay の報告もある。

われわれも最近開発された栄研イムノケミカル研究所製 RIA kit (以下 Eiken kit と略す)、Clinical

Assays 社製 RIA kit (以下 Clinical Assays kit と略す)、Mallinckrodt 社製 RIA kit (以下 Mallinckrodt kit と略す) の基礎的、臨床的検討を行ったので報告する。さらにこれらの kit においては、PAP を精製した組織および精製方法に違いがあり、Eiken kit では前立腺肥大症組織を用い affinity, ion exchange chromatography, gel filtration により PAP を精製している¹⁶⁾。Clinical Assays kit では前立腺肥大症組織および精漿より PAP を affinity chromatography, gel filtration を用い精製している^{17,18)}。Mallinckrodt kit では精漿を用い主として gel filtration を繰り返して PAP を精製している¹⁹⁾。したがって各 kit 間の相互比較もあわせて行なった。

I. 対象と方法

基礎的検討：臨床的検討に先立ち、3社 kit の基礎的検討を以下の項目について行なった。1) 標準曲線

Table 1. Number of cases and age distribution of male and female subjects in the investigation of serum PAP

RIA kits	RIA kits		
	Eiken kit	Clinical Assays kit	Mallinckrodt kit
Normal subjects and patients			
Normal male subjects and patients with non-prostatic diseases	75 5 y.o.-82 y.o.	57 5 y.o.-82 y.o.	34 20 y.o.-78 y.o.
Patients with B.P.H.	33 56 y.o.-79 y.o.	25 56 y.o.-78 y.o.	15 56 y.o.-78 y.o.
Normal female subjects and female patients	17 13 y.o.-82 y.o.	7 28 y.o.-78 y.o.	13 13 y.o.-78 y.o.
Patients with untreated prostatic carcinoma	49 58 y.o.-80 y.o.	37 58 y.o.-80 y.o.	21 62 y.o.-82 y.o.
treated	16 63 y.o.-78 y.o.	15 63 y.o.-78 y.o.	13 63 y.o.-78 y.o.
Total	190	141	96

Table 2. RIA procedures in three kits

	Eiken	Clinical Assays	Mallinckrodt
Standard or patient serum	0.1 ml	0.1 ml	0.2 ml
+ Anti-PAP serum	0.2 ml	0.1 ml	0.1 ml
↓ (Incubation at room temperature)	20 hours	18 hours	2 hours
↓ ¹²⁵ I-labeled PAP	0.2 ml	0.1 ml	0.2 ml
↓ (Incubation at room temperature)	20 hours	3 hours	2 - 24 hours
↓ Second antibody	0.2 ml	1.0 ml	1.0 ml
↓ (Incubation at room temperature)	30 minutes	30 minutes	0 minutes
↓ Centrifugation and aspiration of supernatant	2000xg for 30 minutes	1000xg for 20 minutes	2000x g for 20 minutes
	↓ Estimation of amount of radioactivity with gamma counter		
	↓ Determination of standard curve and PAP level in patient serum		

の再現性, 2) 各種濃度での再現性, 3) 希釈試験, 4) 回収試験, 5) 3社 kit 間の関係, 6) 各種濃度での RIA と enzyme assay との相関性, 7) 温度が PAP に与える影響すなわち RIA と enzyme assay との測定値の差の比較。

臨床的検討: 末梢血 PAP (以下 PAP と略す。ただし enzyme assay による PAP と区別する場合には PAP-RIA と略す) の測定には、肘静脈より採血後ただちに分離を行ない -20°C で保存した血清を用いた。対象は Table 1 に示したように正常男女成人、前立腺以外の泌尿生殖器疾患男子症例、泌尿器疾患女子症例、組織学的に確認された前立腺肥大症および前立腺癌症例である。症例数は各 kit で差があり Eiken kit では 190 例、Clinical Assays kit では 141 例、Mallinckrodt kit では 96 例であった。

測定方法: RIA による PAP の測定は Table 2 に示したように各 kit に添付された manual に従って行なった。なお実際の測定値の算出には 3 次回帰曲線を用いたが、標準血清の最低濃度より測定限界を Eiken kit では 1.25 ng/ml、Clinical Assays kit では 1.0 ng/ml、Mallinckrodt kit では 1.0 ng/ml とし、これら以下の値を not detected (以下 N.D. と略す) と表現した。enzyme assay による TAP (以下 TAP-Enzyme assay あるいは単に TAP と略す) の測定は Kind-King 法により行ない、さらに一部 L-tartrate を用いて PAP (以下 PAP-Enzyme assay と略す) も測定した。なお TAP-Enzyme assay, PAP-Enzyme assay の正常値はそれぞれ 1.7 ~ 7.2 IU/L, 0 ~ 1.4 IU/L である。

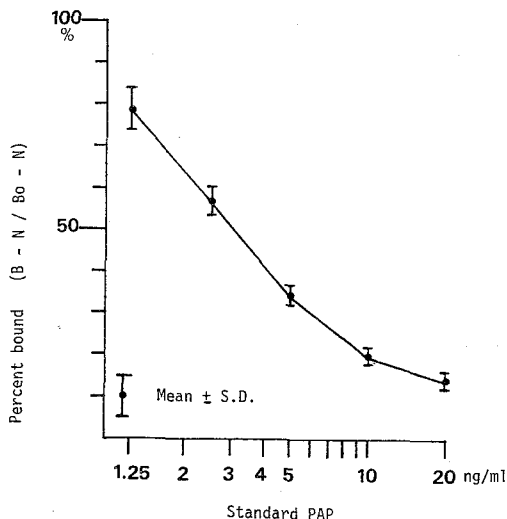


Fig. 1. Standard calibration curve of Eiken's RIA kit

II. 結 果

基礎的検討: 1) 標準曲線の再現性 (Fig. 1~3), Eiken kit, Clinical Assays kit, Mallinckrodt kit と、それぞれの標準血清の各濃度での再現性は良好であった。各 kit の標準血清の percent bound をプロットして得られた標準曲線は、いずれも直線に近似し良好な結果であった。

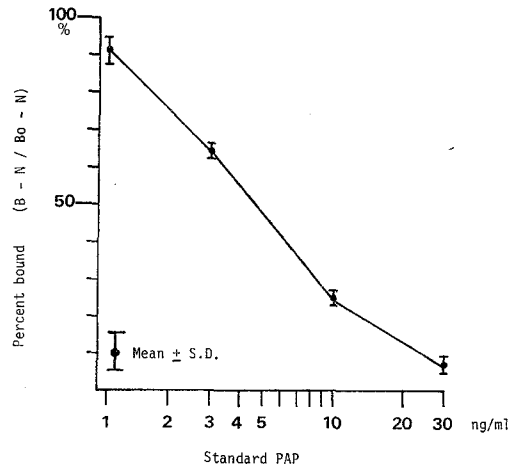


Fig. 2. Standard calibration curve of Clinical Assays' RIA kit

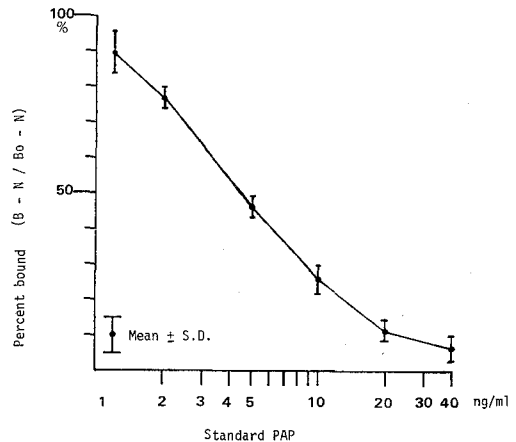


Fig. 3. Standard calibration curve of Mallinckrodt's RIA kit

2) 各種濃度における再現性 (Table 3~5), within assay での再現性を高, 中, 低濃度において検討したが、Eiken kit では C.V. が 2.1 ~ 7.4% と全体的に再現性は良好であった。Clinical Assays kit では、いずれの濃度においても C.V. は 2.8 ~ 14.5% と比較的良

Table 3. Reproducibility of Eiken's kit within assay and between assays

Sample number		I	II	III	IV
Within assay		2.3	7.7	11.8	19.9
		2.3	7.2	11.7	17.8
	(ng/ml)	2.2	7.8	11.8	17.0
		1.9	7.4	12.3	16.5
		2.0	7.2	11.7	18.5
	Mean (ng/ml)	2.1	7.5	11.9	17.9
	S.D. (ng/ml)	0.17	0.28	0.25	1.34
	C.V. (%)	5.7	3.8	2.1	7.4

Sample number		I	II	III
Between assay		1.4	8.1	18.2
		1.3	8.4	16.1
	(ng/ml)	1.5	7.5	15.5
		1.1	7.4	13.1
	Mean (ng/ml)	1.3	7.9	15.7
	S.D. (ng/ml)	0.18	0.49	2.10
	C.V. (%)	14.3	6.2	13.3

好な結果であった。Mallinckrodt kit では各濃度においても C.V. は 8.0~11.1% となり、これも比較的良好な結果であった。between assay での再現性も高、中、低濃度で検討した（ただし Clinical Assays kit での再現性は中、低濃度での検討であり、また検体は kit に添付されていたものを用いた）。Eiken kit では高、低濃度での再現性が中濃度でのそれと比較するとやや劣ったが、C.V. は 6.2~14.4% で比較的良好であった。Clinical Assays kit では C.V. が 9.0~11.2% と再現性は良好な結果であった。Mallinckrodt kit では、いずれの濃度においても C.V. は 6.6~10.6% となり良好な再現性が示された。

3) 希釈試験 (Fig. 4~6), 各 kit とも 2 つの検体を用い 16 倍までの希釈を行ない検討したが、それぞれの測定範囲内ではほぼ直線関係が認められた。

4) 回収試験 (Table 6), 任意の sample と各 kit の任意の標準血清を 1:1 に混合して得られた sample での回収率は、各 kit とも平均 101.2~105.6% であ

り良好な結果が得られた。

5) 各 kit 間の関係 (Fig. 7, 8), Eiken kit の標準血清を Clinical Assays kit, Mallinckrodt kit で測定し検討してみると、Eiken kit (Y) と Clinical Assays kit (X) との関係では $r=0.999$ ときわめて良い相関が示され、 $Y=0+1.1X$ とほぼ両者の測定値が一致する結果が得られた。一方 Eiken kit (Y) と Mallinckrodt kit では $r=0.994$ と Clinical Assays kit と同様の良い相関が得られたが $Y=-1.0+0.54X$ と相関式では異なった傾向を示した。各 kit 間の関係をさらに検討するために Eiken kit で 3.0 ng/ml 以下の測定値を示した 41 症例の検体を、Clinical Assays kit と Mallinckrodt kit とでそれぞれ測定しその分布を比較検討してみた。その結果 Eiken kit での測定値と Mallinckrodt kit での測定値がほぼ類似の分布を示すのに対し、Clinical Assays kit での測定値はやや低く分布する傾向が認められ測定値自体の相関も低かった。しかし正常値の割合ではいずれもほぼ同じであ

Table 4. Reproducibility of Clinical Assays' kit within assay and between assays

Sample number		I	II	III	IV
Within assay	(ng/ml)	1.7	4.7	12.2	20.7
		2.3	4.4	11.3	19.7
		1.6	5.8	10.3	19.7
		1.9	5.7	11.7	19.6
		1.8	5.4	10.5	20.7
Mean	(ng/ml)	1.86	5.20	11.20	20.10
S.D.	(ng/ml)	0.27	0.62	0.80	0.57
C.V.	(%)	14.5	11.9	7.1	2.8

Sample number		I #	II ##
Between assay	(ng/ml)	2.2	13.3
		1.9	12.2
		1.8	16.7
		2.1	13.6
		2.1	13.2
		2.3	13.2
Mean	(ng/ml)	2.1	13.7
S.D.	(ng/ml)	0.19	1.5
C.V.	(%)	9.0	11.2

control serum 2.0 ng/ml

control serum 12.0 ng/ml

った。

6) 各種濃度での RIA enzyme assay ととの相関 (Fig. 9~11), PAP-RIA と enzyme assay との相関はそれぞれの測定限界値から 20 ng/ml 以下の濃度では, 各 kit とも比較的良好で相関係数は Eiken kit で $r=0.69$, Clinical Assays kit で $r=0.85$, Mallinckrodt kit で $r=0.71$ であった。ただし測定値が低い場合には, この傾向が失われていた。

7) 温度の影響 (Fig. 12), 室温放置での PAP の変化の程度を PAP-RIA (Eiken kit による), TAP-Enzyme assay, PAP-Enzyme assay を同時に行い検討したが検体 I, II とも PAP-RIA が室温放置12~16

時間で約 20% の減少程度に留まるのに対し, enzyme assay ではいずれも 40~50% 程度減少していた。

臨床的検討: 正常男女成人および各種疾患での PAP-RIA の測定結果を Table 7, Fig. 13~17 に示した。正常男子成人および前立腺以外の泌尿生殖器疾患で, 加齢に伴う変化を検討したが一定の傾向は認められなかった。正常女子成人および女子泌尿器疾患での PAP-RIA は, 男子症例と比較するとやや低い傾向にあった。20歳以上の前立腺以外の疾患と正常男子症例での PAP-RIA をもとに, それぞれの kit での正常値を $\text{mean} \pm 2\text{S.D.}$ に設定すると Eiken kit では 2.5 ng/ml 以下, Clinical Assays kit では 2.0 ng/ml

Table 5. Reproducibility of Mellinckrodt's kit within assay and between assays

Sample number		I	II	III	IV
Within assay		1.5	4.7	10.9	19.7
		1.9	4.8	10.3	17.5
	(ng/ml)	1.8	5.5	12.3	23.0
		1.6	5.0	10.5	20.5
		1.7	4.3	12.0	22.8
Mean	(ng/ml)	1.7	4.9	11.2	20.7
S.D.	(ng/ml)	0.16	0.44	0.9	2.3
C.V.	(%)	9.3	9.0	8.0	11.1

Sample number		I	II	III	IV
Between assay		1.6	5.9	15.9	30.4
	(ng/ml)	1.9	7.3	17.2	34.6
		1.8	6.8	14.3	33.3
Mean	(ng/ml)	1.8	6.7	15.8	32.8
S.D.	(ng/ml)	0.15	0.71	1.45	2.15
C.V.	(%)	8.3	10.6	9.2	6.6

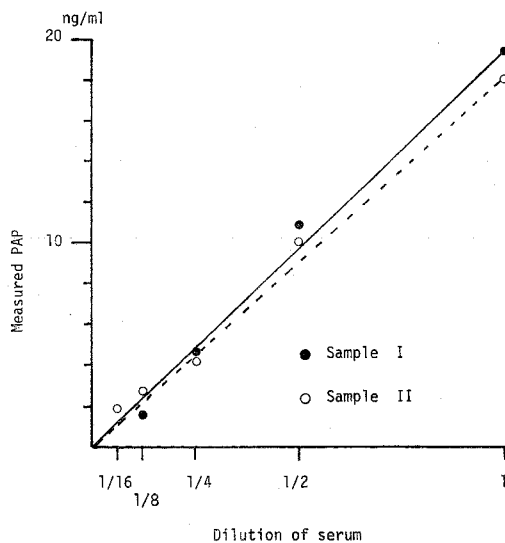


Fig. 4. Relation between measured PAP and the dilution of serum in Eiken's kit

以下, Mallinckrodt kit では 2.2 ng/ml 以下となる。これらの値をもとにすれば前立腺癌を除けば, 正常値を越える測定値を示したのは Eiken kit では前立腺肥大症の 3 例, Clinical Assays kit では前立腺肥大症の 2 例および前立腺以外の泌尿生殖器疾患 (20 歳以上, 男子) の 1 例, Mallinckrodt kit では前立腺肥大症の 1 例という結果であった。

前立腺肥大症および 20 歳以上の前立腺以外の泌尿生殖器疾患で, Eiken kit での測定値を standard として他の kit での測定値と比較してみると (Fig. 18), Eiken kit と Clinical Assays kit との比較では一方の測定値が正常であるにもかかわらず他の測定値が正常を上まわった症例は 57 例中 2 例に認められ, それぞれ前立腺肥大症, 前立腺以外の泌尿生殖器疾患であった。一方 Eiken kit と Mallinckrodt kit とで同様の比較を行なってみると, このような症例は 27 例中 1 例に認められ, これも前立腺肥大症であった。

前立腺癌での PAP の測定結果は Fig. 15~17 に

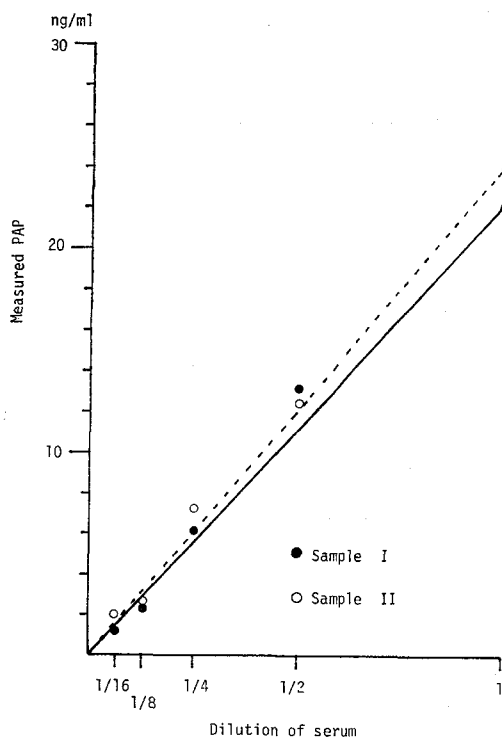


Fig. 5. Relation between measured PAP and the dilution of serum in Clinical Assays' kit

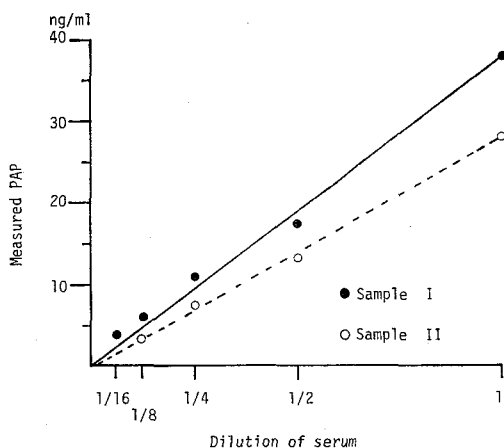


Fig. 6. Relation between measured PAP and the dilution of serum in Mallinckrodt's kit

示したが、clinical stage に従いそれぞれの kit 別に陽性率を検討すると Table 8 に示した結果となった。各 kit の結果を総合した 107 検体で検討してみると、stage A+B での陽性率は 25.8%, C 40.0%, D 85.4% であった。

次に PAP-RIA, enzyme assay での sensitivity と

specificity とを比較検討する目的で各種疾患での PAP-RIA (各 kit での測定検体を合計), TAP-Enzyme assay, PAP-Enzyme assay を同時に測定した検体を用いて検索を行なった。まず各測定法での測定値が、その正常値に対しどの程度の割合 (ratio) になっているかをみた (Fig. 19~24)。前立腺癌では PAP-RIA, PAP-Enzyme assay の方が TAP-Enzyme assay より測定値の ratio は大であった。前立腺肥大症、20 歳以上の前立腺以外の泌尿生殖器疾患では、PAP-Enzyme assay の方が PAP-RIA, TAP-Enzyme assay より測定値の ratio は大きくなる傾向があった。この結果より PAP-RIA, TAP-Enzyme assay, PAP-Enzyme assay での sensitivity と specificity とを算出してみると (Table 9), sensitivity では PAP-RIA 53.3%, TAP-Enzyme assay が 35.5%, PAP-Enzyme assay が 47.7% であった。PAP-RIA と TAP-Enzyme assay とは $p < 0.1$ では差を認めた。PAP-RIA と PAP-Enzyme assay とでは差はなかった。specificity では PAP-RIA が 100%, TAP-Enzyme assay が 95.2%, PAP-Enzyme assay が 76.2% と PAP-RIA と PAP-Enzyme assay では $p < 0.05$ で差を認めた。

III. 考 察

enzyme assay による酸性フォスファターゼの測定には、phenyl phosphate, α -glycerophosphate, β -naphthylphosphate, p-nitrophenolphosphate, sodium thymolphthalein monophosphate, naphthol AS-BI phosphate などが基質として用いられてきた。しかし、これらの基質は PAP に対し特異的ではなく、他の組織由来の酸性フォスファターゼの測定値への混入は避けられない。PAP が L-tartrate labile であるところから、L-tartrate を用いて PAP を特異的に測定する方法もあるがやはり特異性の点で充分とは言えない²⁰⁾。これらの欠点を補うため免疫学的測定法の 1 つである RIA, fluorescent immunoassay, counterimmuno-electrophoresis が開発されている。

今回われわれが検討した Eiken kit, Clinical Assays kit, Mallinckrodt kit では標準曲線の再現性, within assay, between assay, 希釈試験, 回収試験などにおいてはほぼ満足すべき結果を得た。

各 kit 間の相関性に関しては、それぞれの標準血清を用いた検討では良い相関が得られたのに反し、低濃度の検体での検討では必ずしも良好な相関が認められたわけではなかった。この原因の 1 つとして PAP の精製に用いられた組織の違いあるいは精製法の違いが

Table 6. Recovery test in three kits

	Expected value		Recovered value		Recovery rate (%)	
Eiken kit	1.4	ng/ml	1.3	ng/ml	92.9	%
	2.6		2.1		87.5	
	5.5		6.8		123.6	
	11.0		13.9		126.4	
	19.5		18.5		97.4	
Mean					105.6	
Clinical Assays kit	1.5	ng/ml	1.6	ng/ml	106.7	%
	5.0		4.8		96	
	15.5		15.8		101.9	
	25.3		27.0		106.7	
Mean					102.8	
Mallinckrodt kit	1.5	ng/ml	1.4	ng/ml	93.3	%
	5.5		5.4		98.2	
	9.0		9.6		106.9	
	11.5		13.3		115.7	
	21.5		19.8		92.1	
Mean					101.2	%

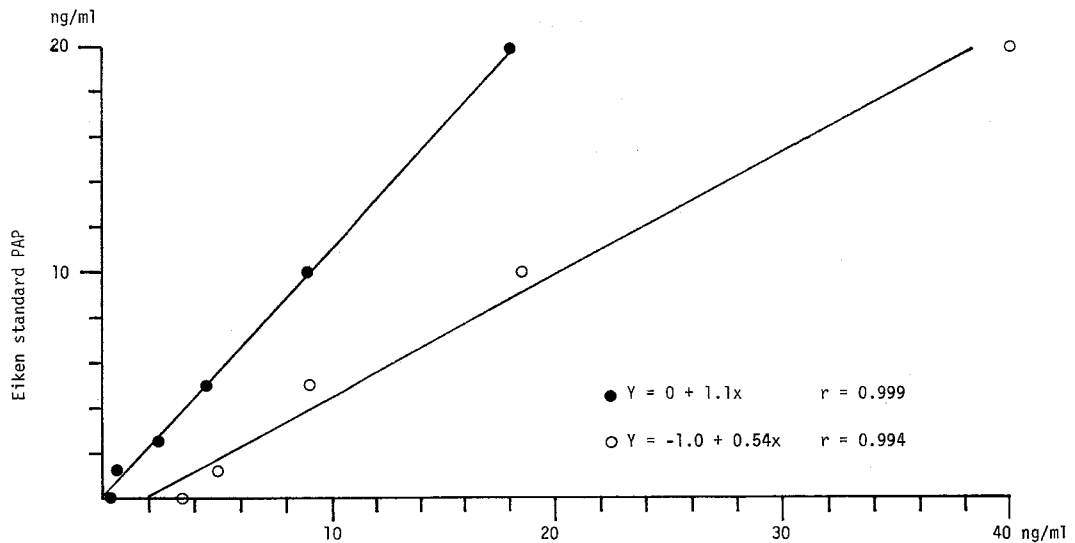
推測される。現在までに報告^{5,15-17,21-23)}されている RIA では、抗原としての PAP を前立腺液、前立腺肥大症組織、前立腺癌組織、精漿などから得ている (Table 10)。さらにこれらの組織からの PAP の精製法も報告者により多少異なっている。その結果得られた正常値も 0~3.0 ng/ml から 5~72 ng/ml と幅のある値になっている。この精製組織、精製方法の違いに関しては PAP の Isoenzyme の問題もあり今後の十分な検討が必要と思われる点である。

しかし、これらの相違があるにもかかわらず、それぞれの正常値を基準にして比較してみると、正常あるいは正常を上回る割合はほぼ同程度で、臨床的に問題となる場合は少ないと推測される。

Enzyme assay の欠点の1つである温度に対する不安定性が PAP-RIA ではどの程度になっているかを検討してみたが、Foti ら²⁴⁾も報告しているように PAP-RIA の方が TAP-Enzyme assay あるいは PAP-Enzyme assay より安定であることが示された。

既述のように各 kit の正常値を mean+2S.D. を基準にして設定したが、臨床的には各 kit とともに 2.5~3.0 ng/ml が適当であると思われる。

前立腺癌以外ではこれらの正常値を越えた検体は少なかった。一方前立腺癌では stage が進行するに伴い各 kit での陽性率は高くなる傾向があったが、stage A+B での陽性率は一般に低かった。各 kit 間で stage 別の陽性率に差があるのは、全例が同一症例ではない



PAP level measured by Clinical Assays (●) and Mallinckrodt (○) kit

Fig. 7. Relation among three kits. Eikens' standard. PAP were measured as the standard by Clinical Assays' and Mallinckrodt's kit

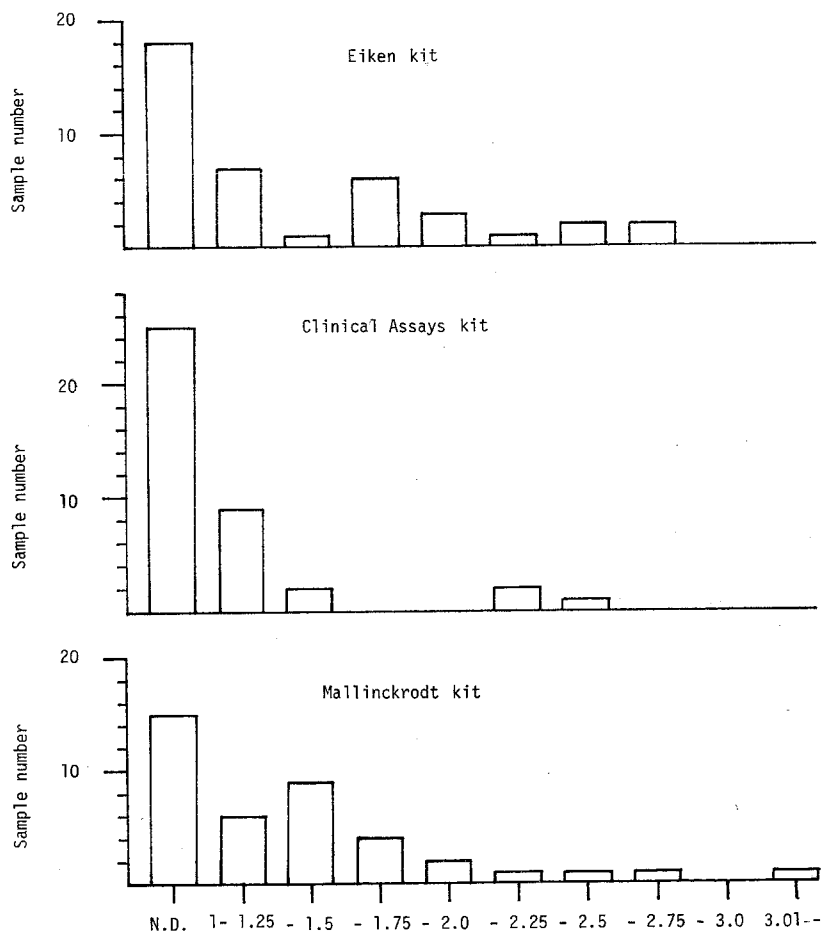


Fig. 8. Relation of PAP level near normal range in three kits (41 samples)

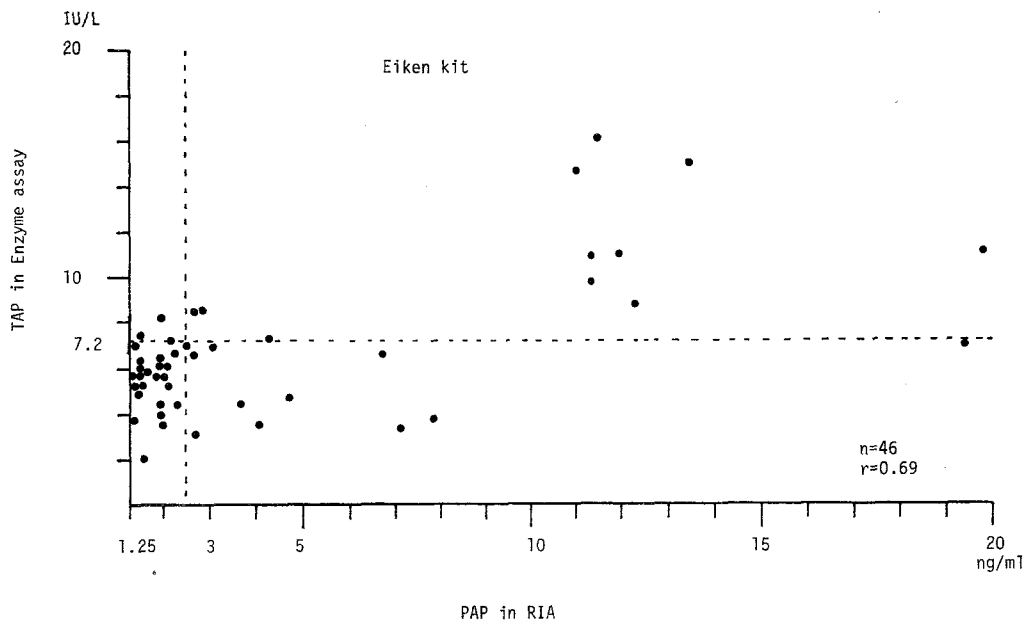


Fig. 9. Relation between PAP in RIA and TAP in Enzyme assay
(----- normal range)

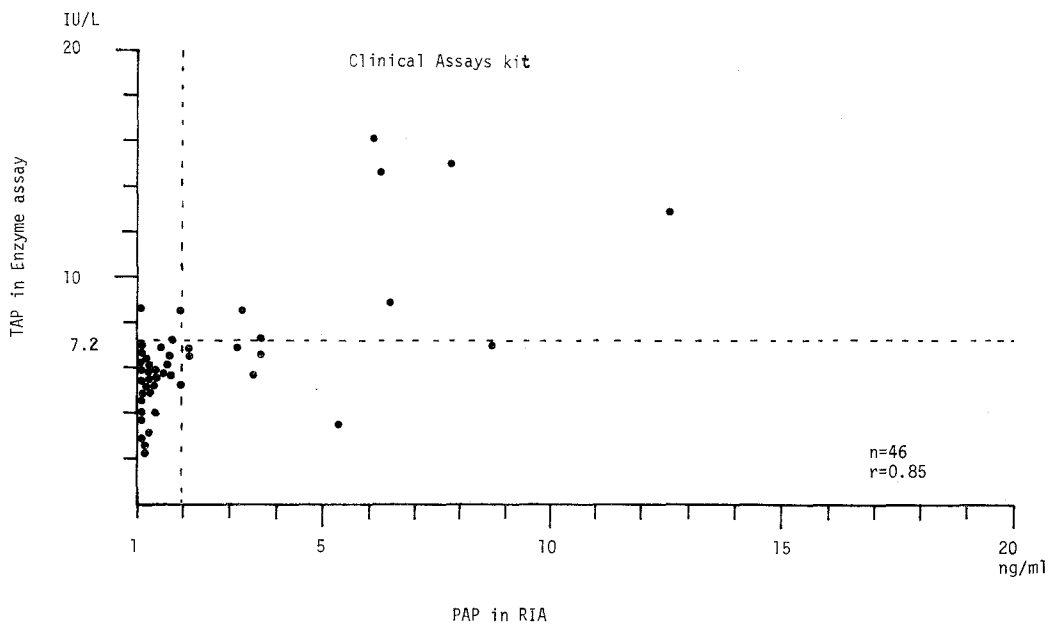


Fig. 10. Relation of between PAP in RIA and TAP in Enzyme assay
(----- normal range)

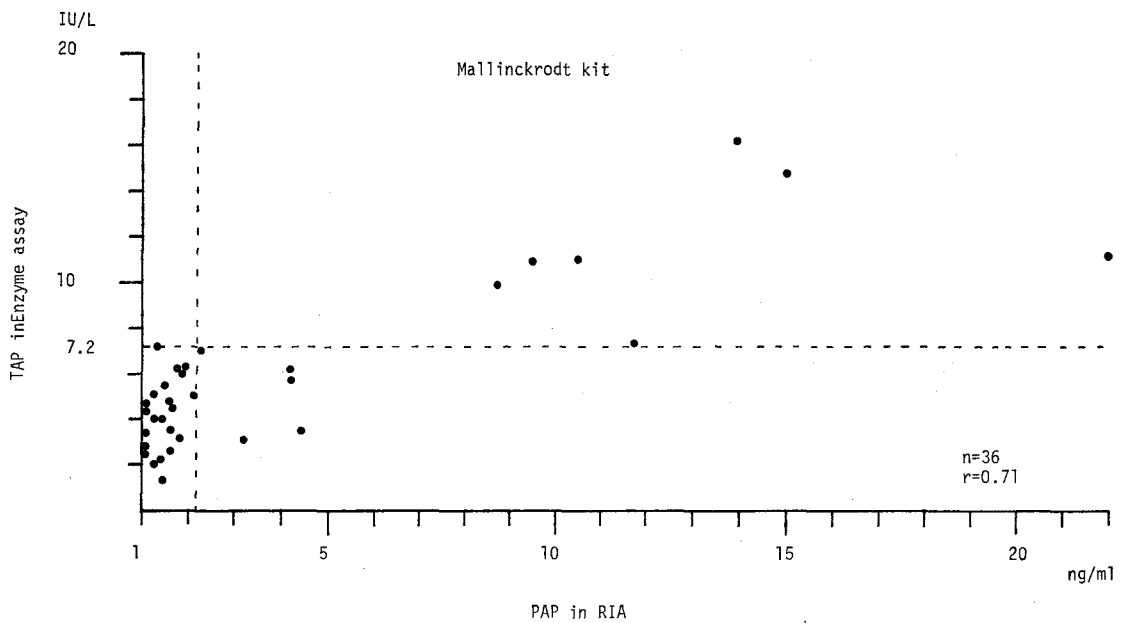


Fig. 11. Relation between PAP in RIA and TAP in Enzyme assay
(----- normal range)

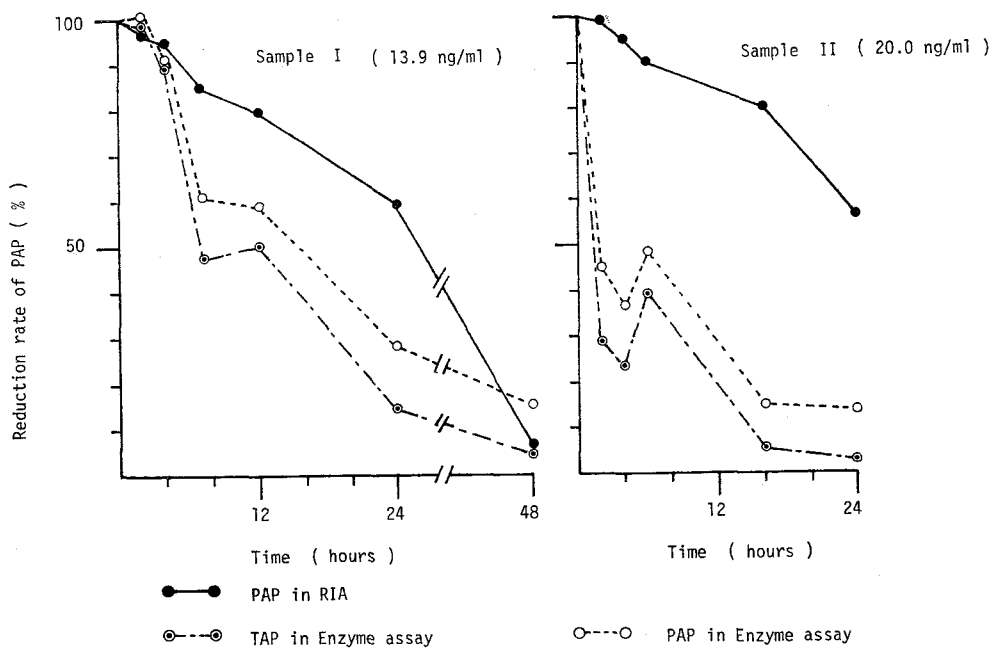


Fig. 12. Influence of room temperature on PAP. RIA by Eiken's kit and Enzyme assay by Kind-King's procedure

Table 7. PAP in normal subjects and the patients with urological diseases
(Mean \pm S.D. ng/ml)

Group	RIA systems					
	Eiken kit		Clinical Assays kit		Mallinckrodt kit	
Normal male subjects and patients with non-prostatic diseases	1.8 \pm 0.33	(n=75)	1.4 \pm 0.31	(n=57)	1.6 \pm 0.31	(n=34)
5 - 19 y.o.	1.7 \pm 0	(n=11)	1.2 \pm 0.21	(n=11)	—	—
20 - 49 y.o.	1.9 \pm 0.33	(n=38)	1.5 \pm 0.28	(n=21)	1.6 \pm 0.28	(n=17)
50 - 82 y.o.	1.8 \pm 0.40	(n=26)	1.3 \pm 0.39	(n=25)	1.5 \pm 0.35	(n=17)
Patients with B.P.H.	1.9 \pm 0.53	(n=33)	1.4 \pm 0.68	(n=25)	1.6 \pm 0.40	(n=15)
Normal female subjects and female patients	1.4 \pm 0.32	(n=17)	1.3 \pm 0	(n= 7)	1.3 \pm 0.09	(n=13)

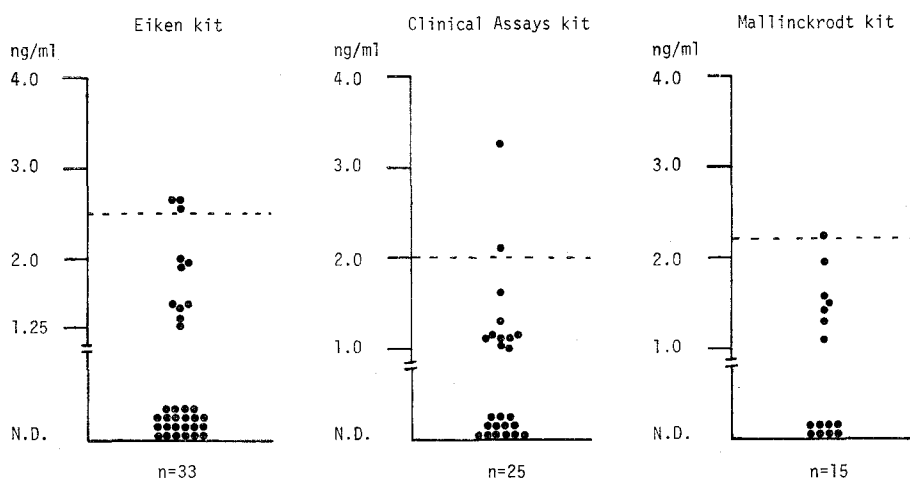


Fig. 13. Distribution of PAP in patients with B.P.H. (N.D., not detected)

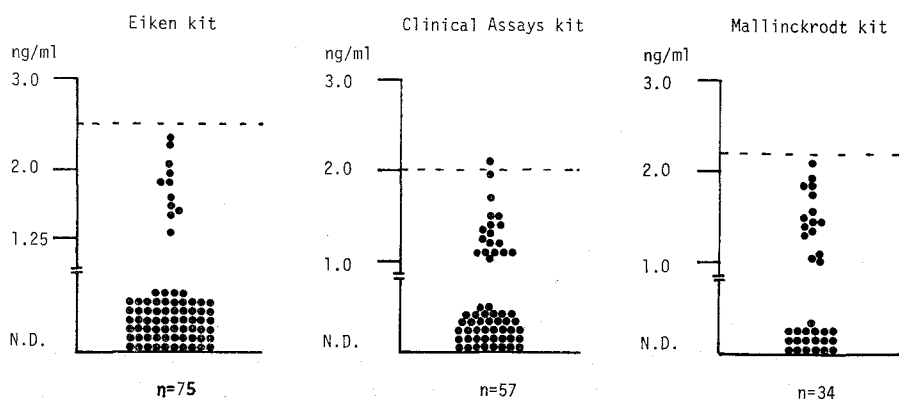


Fig. 14. Distribution of PAP in the patients with non-prostatic diseases (N.D., not detected)

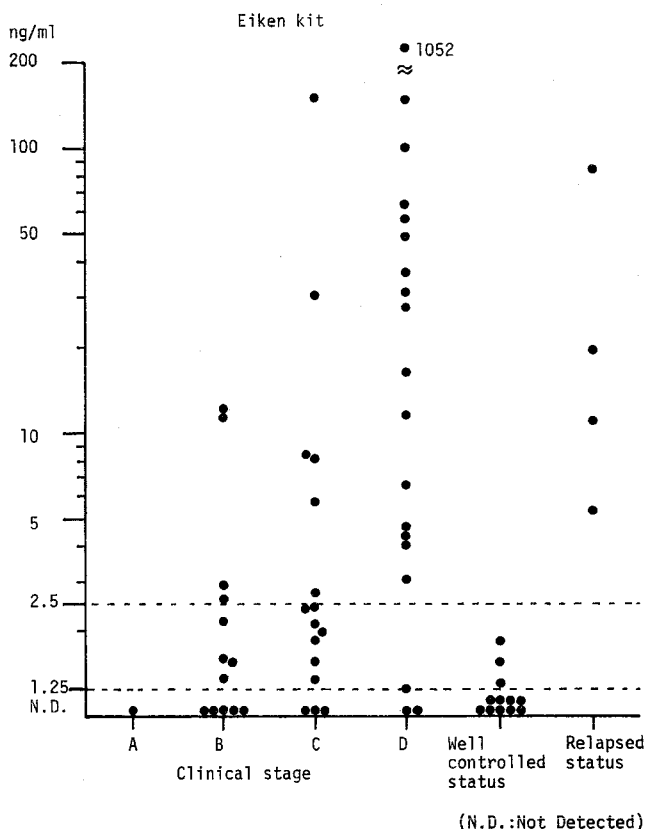


Fig. 15. PAP measured by Eiken's kit in patients with prostatic carcinoma

ためと考えられる。

RIA, counterimmunoelectrophoresis による他の報告での陽性率は, Foti ら²⁵⁾によれば stage A 33%, stage B 79%, stage C 71%, stage D 92% ときわめて高い成績であるが, Griffiths²⁷⁾, Murphy ら²⁵⁾, Bruce ら²⁷⁾は stage A 12~38%, stage B 29~35%, stage C 24~49%, stage D 68~89% と報告している (Table 11). 本邦では丸岡ら¹⁰⁾, 町田ら¹³⁾の報告があるが, 前者では stage A+B 25%, stage C 50%, stage D 83%, 後者では stage A+B 62.5%, stage C 85.8%, stage D 100% となっている。われわれが得た結果は各 kit での検体数を合計すると Griffiths²⁷⁾, Bruce ら²⁷⁾の成績に近い。症例数が一定程度以上の報告をもととすれば, Foti 以外の報告では stage A+B での陽性率は低い。

ところで, 現在前立腺癌の screening 手段として種々の方法が用いられているが, RIA による方法はこれらの方法を上まわる精度を示しているのであろうか。Bruce ら²⁷⁾は Table 11 に示した Foti らの成績や彼ら自身の成績より判断して stage A の前立腺癌

を screening するためには, 現時点では RIA は充分ではないとしている。われわれの成績からみても現時点では充分とは言えない。しかし, この点に関しては, RIA による PAP の測定自体の問題のほかに前立腺癌での PAP 上昇の機序にも問題があると思われる。一般的には PAP の前立腺癌での上昇は腫瘍の絶対量と関係すると考えられるが, それ以外に前立腺癌組織の分化度²⁾, 前立腺癌の個々の細胞での PAP 分泌能力²⁷⁾などがさらに関与していると言われている。したがって前立腺癌での PAP の陽性率を問題にする場合には, この点に関しても充分な検討が必要と考えられる。

最近, Kuriyama, Chu ら²⁸⁾により prostatic antigen の enzyme immunoassay が開発されているが PAP と性格を異にした “marker” と考えられ, これらを併用することで既述の問題点がどの程度解決されるものか興味深く, 今後の詳細な報告が期待される。

さて RIA と enzyme assay との精度の比較では sensitivity では PAP-RIA と PAP-Enzyme assay は同程度であり, TAP-Enzyme assay はこれらより劣る

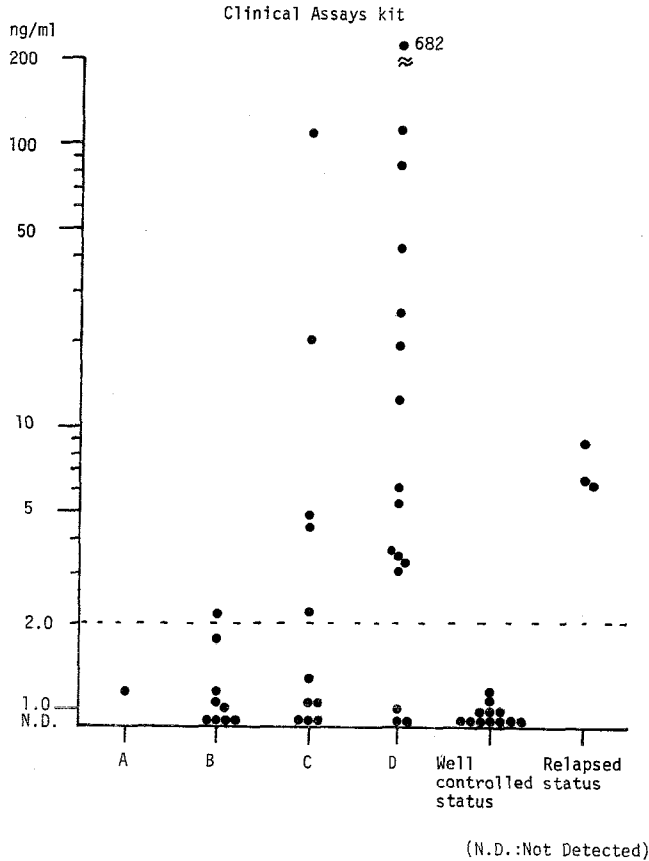


Fig. 16. PAP measured by Clinical Assays' kit in patients' with prostatic carcinoma

結果となった。一方 specificity では PAP-RIA と TAP-Enzyme assay とがほぼ同程度で PAP-Enzyme assay がこれらより劣っていた。sensitivity と specificity とを総合すると PAP-RIA が TAP-Enzyme assay, PAP-Enzyme assay より優れていると結論することができる。他の報告²⁷⁾でもこの点に関しては同様の結論である。ただ、実際の臨床での enzyme assay による TAP, PAP の有用性すなわち 1) 特殊な測定装置を必要としない。2) 短時間で結果が判明するなど RIA にない利点であり、これらの点を含めて RIA の有用性が enzyme assay の有用性をはるかに凌駕するためには今後のさらなる検討が必要と考えられる。

IV. ま と め

1. Eiken kit, Clinical Assays kit, Mallinckrodt kit の基礎的検討を行ない以下の結果を得た。1) 標準曲線の再現性は各 kit とも満足すべき結果であり、標準曲線においても良好な直線を得た。2) 各濃度に

おける再現性を within assay, between assay で検討した。within assay においては Eiken kit で C.V. が 2.1~7.4%, Clinical Assays kit で 2.8~14.5%, Mallinckrodt kit で 9.0~11.1% となり満足すべき結果であった。between assay では各 kit とも C.V. が 6.2~14.3% となり良好な結果であった。3) 希釈試験での検討では各 kit とも 1/16 希釈まででは良好な直線を示した。4) 回収率を検討した結果各 kit とも 100% 前後の値を得ることができた。これらの結果より各 kit とも臨床的に充分使用しうると判断できる。

2. Eiken kit の標準血清を Clinical Assays kit, Mallinckrodt kit で測定することにより各 kit 間の相関性を検討したが、いずれの場合も良い相関が得られた。しかし、Eiken kit で 3.0 ng/ml 以下の低濃度の 41 検体を Clinical Assays kit, Mallinckrodt kit で測定した結果では相関性が低下していた。一方、これらの検討を各 kit の正常値を基準にして、測定値が正常あるいは正常を越える頻度で比較してみると、各 kit 間の差は認められなかった。さらに同様の比較を前立

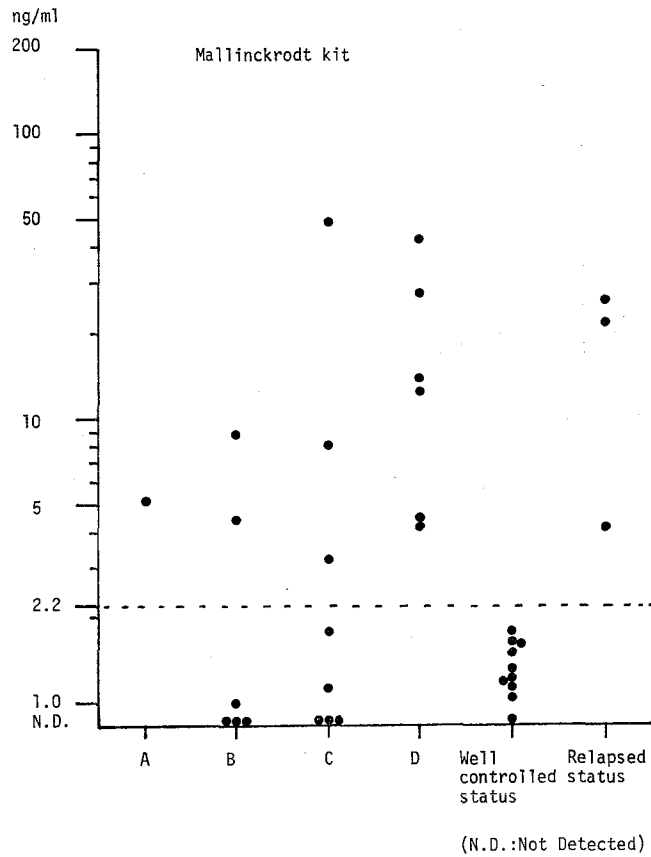


Fig. 17. PAP measured by Mallinckrodt's kit in patient's with prostatic carcinoma

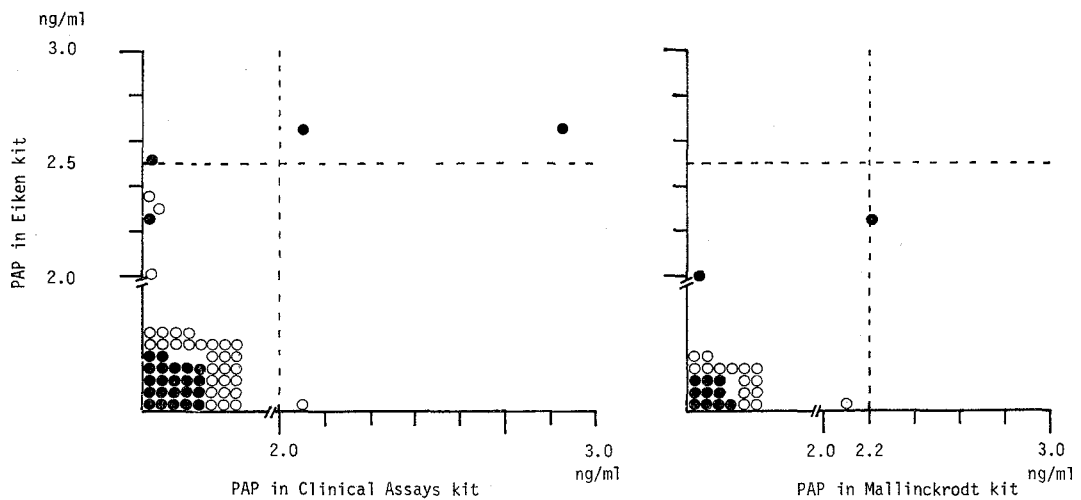


Fig. 18. Relation of PAP level among three kits in the patients with B.P.H.(●) and non-prostatic diseases(○) above twenty year old

Table 8. Positive PAP in patients with prostatic carcinoma

Prostatic carcinoma	* Cliniccal Assays *						**	
	Eiken kit		Cliniccal kit		Mallinckrodt kit		Total samples	
Prostatic carcinoma	26/49	53.1 %	19/37	51.4 %	12/21	57.1 %	57/107	53.3 %
stage A & B	4/14	28.6 %	1/10	10.0 %	3/ 7	42.9 %	8/31	25.8 %
stage C	6/16	37.5 %	5/11	45.5 %	3/ 8	37.5 %	14/35	40.0 %
stage D	16/19	84.2 %	13/16	81.3 %	6/ 6	100 %	35/ 41	85.4 %

* positive cases in each kit / total cases in each kit

** positive samples in all kits / total samples in all kits

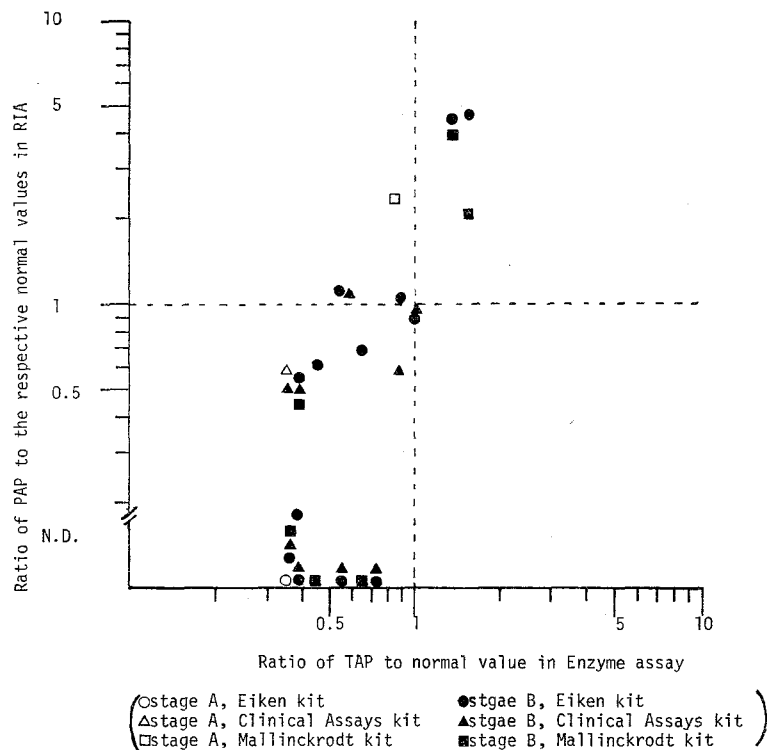


Fig. 19. Relation between PAP-RIA and TAP-Enzyme assay in 31 samples with stage A and B prostatic carcinoma

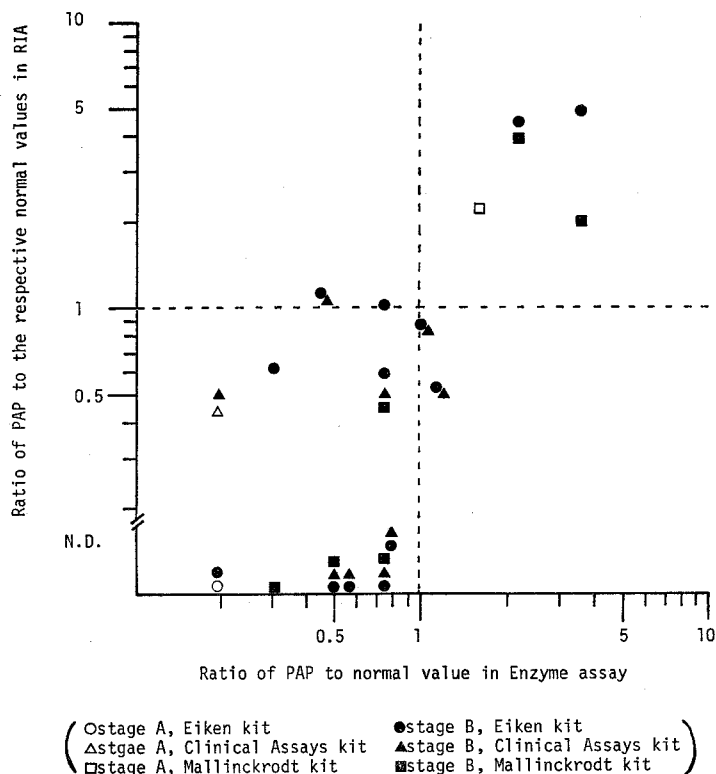


Fig. 20. Relation between PAP-RIA and PAP-Enzyme assay in 31 samples in stage A and B prostatic carcinoma

腺肥大症、前立腺以外の泌尿生殖器疾患での測定値を用いて、Eiken kit と Clinical Assays kit, Eiken kit と Mallinckrodt kit でそれぞれ行なってみると、測定値が正常あるいは正常を越える割合はほぼ同程度であった。このことは、低濃度での各 kit の相関性の低さが臨床的に問題となることは少ないということを示すと思われるが、この点については PAP の source, 精製法の違いなどが関係していると推測されるため、今後とも十分な基礎的検討が必要である。

3) RIA と Enzyme assay の相関性を検討した結果、全体的には良い相関が認められたが (Eiken kit: $r=0.69$, Clinical Assays kit: $r=0.85$, Mallinckrodt kit: $r=0.71$)、低濃度では相関は低下していた。

4) 正常男女成人、泌尿生殖器疾患男女症例 (Eiken kit: 190例, Clinical Assays kit: 141例, Mallinckrodt kit: 96例) において計427検体で PAP を測定した。正常値は Eiken kit 2.5 ng/ml 以下, Clinical Assays kit で 2.0 ng/ml 以下, Mallinckrodt kit で 2.2 ng/ml 以下であった。臨床的には各 kit とも 2.5~3.0 ng/ml 以下が適当ではないかと思われた。

前立腺癌以外でこれらの正常値を越えた症例は、Eiken kit では前立腺肥大症の3例, Clinical Assays kit では前立腺肥大症の2例を前立腺以外の泌尿生殖器疾患の1例, Mallinckrodt kit では前立腺肥大症の1例であった。前立腺癌での PAP の陽性率は、stage A+B, C, D において Eiken kit ではそれぞれ 28.6%, 37.5%, 84.2%であり, Clinical Assays kit ではそれぞれ10%, 45.5%, 81.3%, Mallinckrodt kit ではそれぞれ 42.9%, 37.5%, 100%であった。各 kit でのすべての症例が同一ではないのでこの間の陽性率の比較はできなかった。各 kit での検体を合計すると stage A+B 22.6%, C 37.1%, D 85.4%であり, stage A+B の陽性率は低かった。

5) sensitivity, specificity を検討してみると、PAP-RIA では sensitivity が53.3%, specificity が100%, TAP-Enzyme assay ではそれぞれ 35.5%, 94.9%, PAP-Enzyme assay ではそれぞれ 48.6%, 75.9% となり、これらの結果より RIA が enzyme assay より秀れた測定法であると言えるが、今後さらに改良すべき点の検討は必要である。

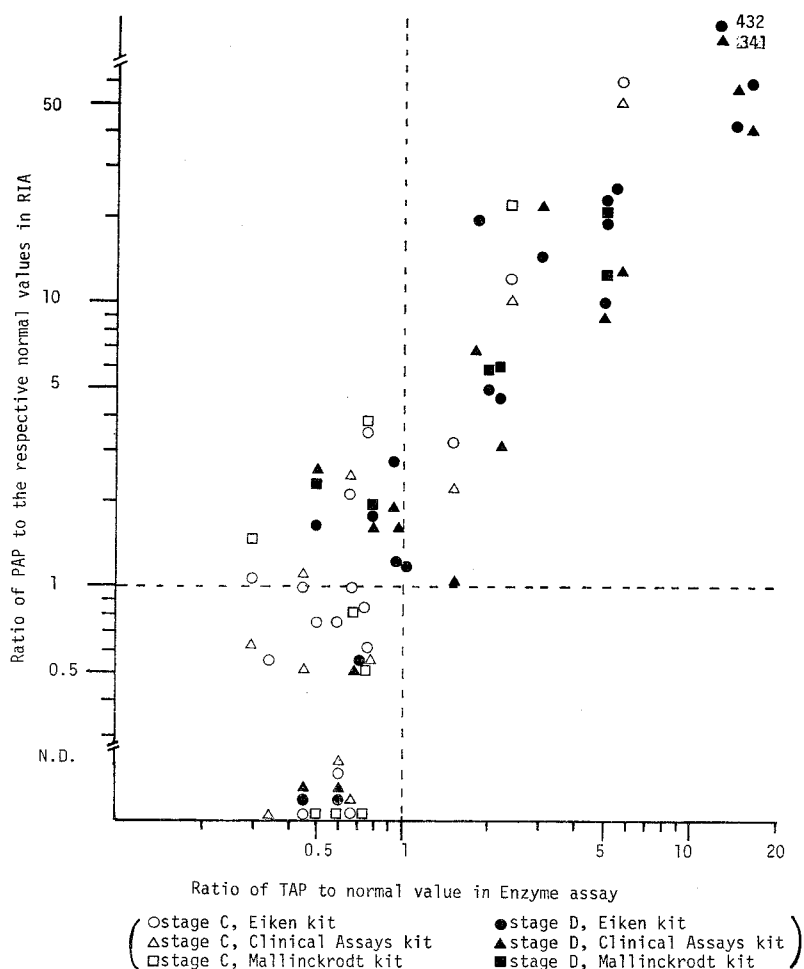


Fig. 21. Relation between PAP-RIA and TAP-Enzyme assay in 35 samples with stage C, and in 41 samples with stage D prostatic carcinoma

6) 前立腺癌の早期発見のための screening に RIA を用いることは現時点では充分でないと考えられ、さらにこの点の解決には前立腺癌での PAP の上昇の機序も同時に検討する必要がある。

稿を終えるにあたり、御協力いただいた本間昭雄先生、青山龍生先生（旭川赤十字病院 泌尿器科）、古屋聖児先生、横山英二先生（北見赤十字病院 泌尿器科）、水戸部 勝幸先生（市立酒田病院 泌尿器科）に深謝する。また kit の提供を受けた栄研イムノケミカル研究所、トラベノール ラボラトリー、第 1 ラジオアイソトープ社の御協力を感謝する。

文 献

1) Gutman AB, Gutman EB: An acid phosphatase

occurring in serum of patients with metastazing carcinoma of prostate gland. J Clin Invest 17: 473~478, 1938

- 2) Shulman S, Momard L, Gonder MJ, Soanes WA: The detection of Prostatic acid phosphatase by antibody reaction in gel diffusion. J Immunol 93: 474~480, 1964
- 3) Moncure CW, Prout GRJr, Blaylock WK: Prostatic acid phosphatase antisera. Invest Urol 5: 331~341, 1968
- 4) Prout GRJr, Ornellas EP: Immunology of the prostate. Urol Clin N Am 2: 93~104, 1975
- 5) Foti AG, Hershman H, Cooper JF: A solid-phase radioimmunoassay for human prostatic

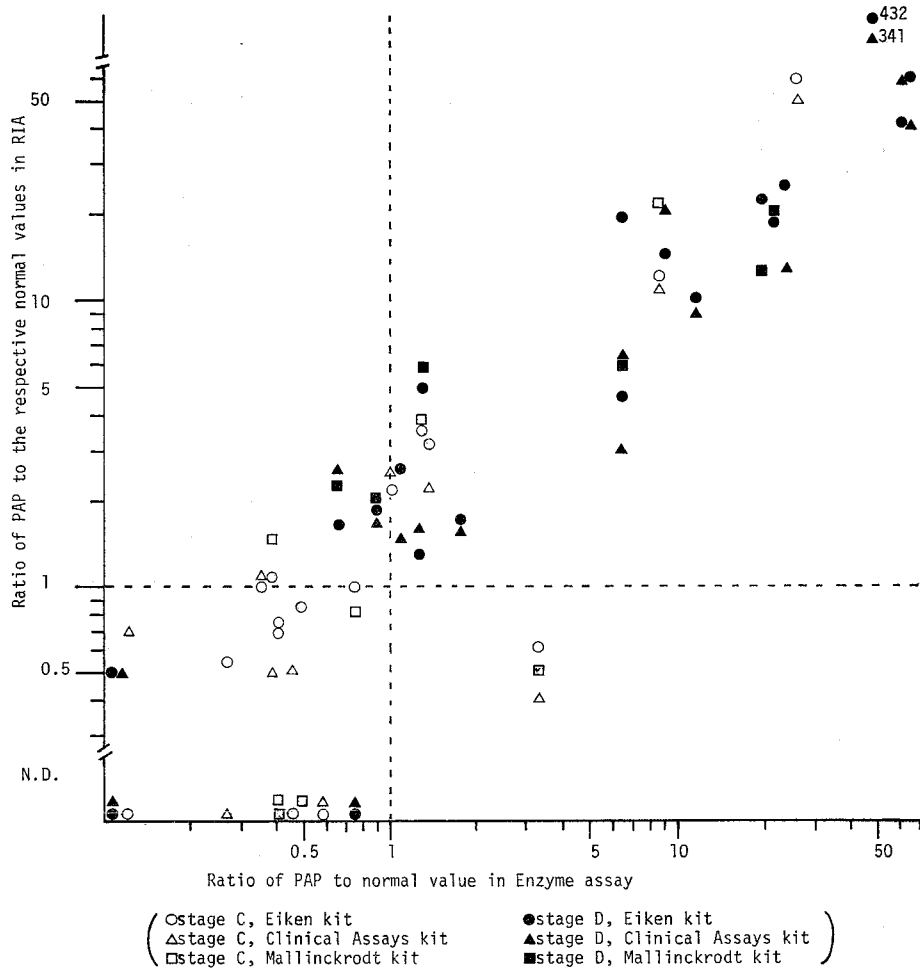


Fig. 22. Relation between PAP-RIA and PAP-Enzyme assay in 35 samples with stage C, and in 41 samples with stage D prostatic carcinoma

acid phosphatase. *Cancer Res* 35: 2446~2452, 1975

- 6) Belville WD, Cox HD, Mahan DE, Olmert JP, Mittermeyer BT: Bone marrow acid phosphatase by radioimmunoassay. *Cancer* 41: 2286~2291 1978
- 7) Griffiths JC: Prostate-specific acid phosphatase: Re-evaluation of radioimmunoassay in diagnosing prostatic disease. *Clin Chem* 26: 433~436, 1980
- 8) Choe BK, Pontes EJ, Morrison MK, Rose NR: Human prostatic acid phosphatases: II. A double-antibody radioimmunoassay. *Arch Andol* 1: 227~233, 1978
- 9) Vihko P, Sajanti E, Janne O, Peltonen L,

Vihko R: Serum prostate-specific acid phosphatase: Development and validation of a specific radioimmunoassay. *Clin Chem* 24: 1915~1919 1978

- 10) 丸岡正幸・野積邦義・伊藤晴夫・島崎 淳・村上信乃: 前立腺性酸性フォスファターゼ: Enzymatic assay, Couterimmuno-electrophoresis (CIEP) および Radioimmunoassay (RIA) 法による比較. *西日泌尿* 42: 1159~1164, 1980
- 11) 飯屋元博・山本敏廣・小川 修: Radioimmunoassay 法による prostatic acid phosphatase 測定 of 臨床的評価. *西日泌尿* 42: 1151~1158, 1980
- 12) 森下直由・小川繁清・斎藤 泰・近藤 厚: DRL-917 キットによる酸性フォスファターゼ測定法の検討. *泌尿紀要* 26: 899~904, 1980

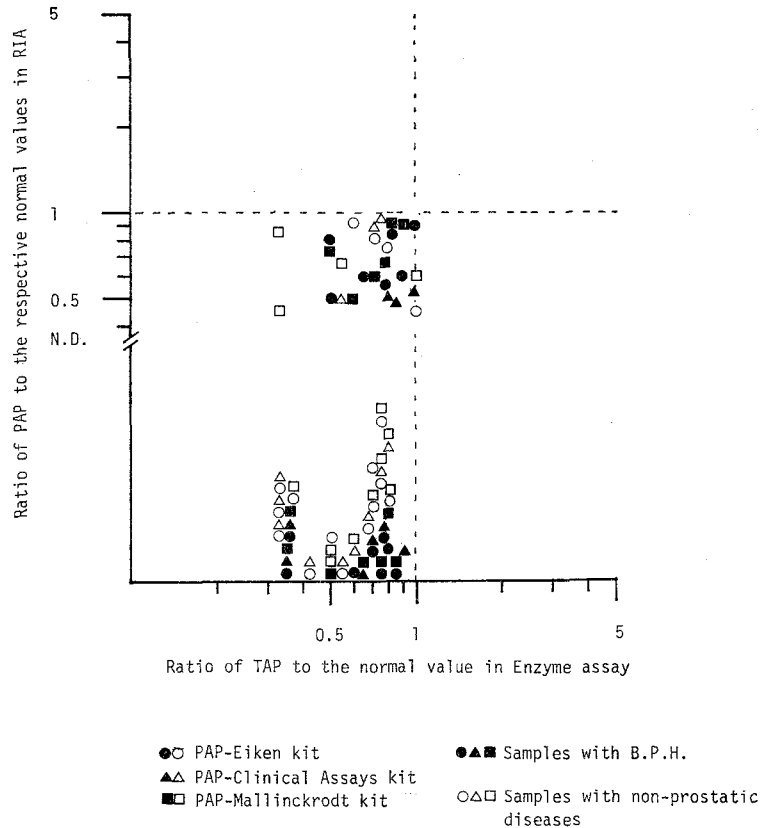


Fig. 23. Relation between PAP-RIA and TAP-Enzyme assay in 37 samples with B.P.H., and in 42 samples with non-prostatic diseases

- 13) 町田豊平・三木 誠・大石幸彦・上田正山・木戸晃・柳沢宗利・吉田正林：RIA による前立腺性酸性フォスファターゼの価値。日泌尿会誌 72: 416~422, 1981
- 14) 駕海良彦・鴨井逸馬・一矢有一・井本 武・馬場裕子・松浦啓一・上田豊史・黒田憲行・百瀬俊郎：前立腺疾患に対する RIA-Quant PAP test kit による血清 prostatic acid phosphatase 測定の臨床的意義。西日泌尿 42: 1141~1145, 1980
- 15) Lee C, Wang MC, Murphy GP, Chu TM: A solid-phase fluorescent immunoassay for human prostatic acid phosphatase. Cancer Res 38: 2871~2878, 1978
- 16) 森川淳二・中村雅行・森 一泰・大沢劉三郎・三木 誠・町田豊平：ラジオイムノアッセイによるヒト前立腺酸性フォスファターゼの定量法の開発。Radioisotopes 29: 175~180, 1980
- 17) Etten RLV, Saini S: Selective purification of tartrate-inhibitable acid phosphatases: Rapid

and efficient purification (to homogeneity) of human and canine prostatic acid phosphatase. Clin Chem 24: 1525~1530, 1978

- 18) トラベノールラボラトリー：私信
- 19) 第1ラジオアイソトープ社：私信
- 20) Yam LT: Clinical significance of the human acid phosphatases. Am J Med 56: 604~616, 1974
- 21) Choe BK, Pontes EJ, Rose NR: Human prostatic acid phosphatase: I. Isolation. Arch Androl 1: 221~226, 1978
- 22) Vihko P, Kontturi M, Korhonen LK: Purification of human prostatic acid phosphatases by affinity chromatography and isoelectric focusing Part I. Clin Chem 24: 466~470, 1978
- 23) Mahan DE, Doctor BP: A radioimmune assay for human prostatic acid phosphatases level in prostatic disease. Clin Chem 12: 10~17, 1979
- 24) Foti AG, Hershman H, Cooper JF: Comparison

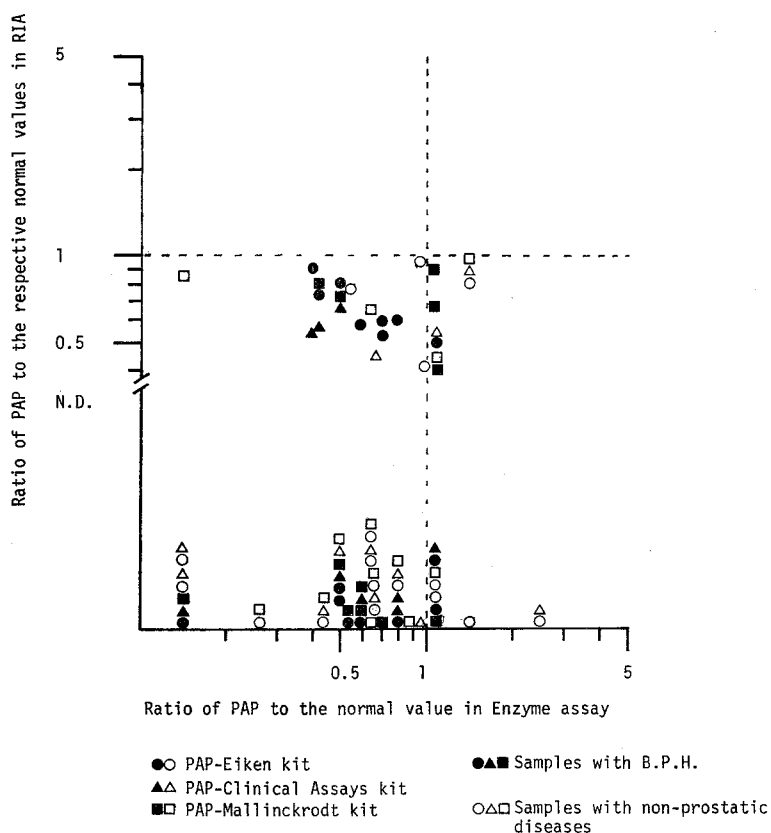


Fig. 24. Relation between PAP-RIA and PAP-Enzyme assay in 37 samples with B.P.H., and 42 samples with non-prostatic diseases

Table 9. Sensitivity and specificity of PAP in RIA, and TAP and PAP in Enzyme assay

	PAP-RIA		TAP-Enzyme assay		PAP-Enzyme assay	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Prostatic carcinoma	8/31	23/31	6/31	25/31	9/31	22/31
stage A and B	(25.8 %)	(74.2 %)	(19.4 %)	(80.6 %)	(29.0 %)	(71.0 %)
	14/35	21/35	7/35	28/35	14/35	21/35
stage C	(40.0 %)	(60.0 %)	(20.0 %)	(80.0 %)	(40.0 %)	(60.0 %)
	35/41	6/41	25/41	16/41	29/41	12/41
stage D	(85.4 %)	(15.6 %)	(61.0 %)	(39.0 %)	(70.7 %)	(29.3 %)
	0/37	37/37	2/37	35/37	8/37	29/37
B.P.H.	(0 %)	(100 %)	(5.4 %)	(94.6 %)	(21.6 %)	(78.4 %)
Non-prostatic diseases	0/42	42/42	2/42	40/42	11/42	31/42
	(0 %)	(100 %)	(4.8 %)	(95.2 %)	(26.2 %)	(73.8 %)

(Positive or Negative sample number/Total sample number)

Sensitivity PAP-RIA:53.3 % (57/107), TAP-Enzyme assay:35.5 % (38/107), PAP-Enzyme assay:48.6 % (52/107)

Specificity PAP-RIA:100 % (79/ 79), TAP-Enzyme assay:94.9 % (75/ 79), PAP-Enzyme assay: 75.9 % (60/79)

Table 10. Source of PAP, methods of purification and normal range

Sources of PAP	Methods of purification	Normal ranges
1. Prostatic fluid		
Cooper et al 5)	gel filtration	5 - 72
2. Hypertrophic prostate gland		
森 川 ら 16)	affinity, ion exchange chromatography and gel filtration	0 - 3
Etten et al 17)	affinity chromatography and gel filtration	
Choe et al 21)	ion exchange and affinity chromatography	2.5 - 24
Vihko et al 22)	affinity chromatography	0 - 10
3. Malignant prostatic tissues		
Lee et al 15)	affinity, ion exchange chromatography and gel filtration	1.4 - 9.8
4. Seminal plasma		
Mahan et al 23)	ion exchange chromatography	0 - 8.1

Table 11. Elevated PAP in patients with prostatic carcinoma (%)

Clinical stage	Reporters { % }			
	Foti # et al 24)	Murphy ## et al 26)	Griffiths # 7)	Bruce # et al 27)
A	33	38	12	14
B	79	35	32	29
C	71	49	47	24
D	92	69	86	89

RIA, ## Counterimmunoelectrophoresis

- of human prostatic acid phosphatase by measurement of enzymatic activity and radioimmunoassay. *Clin Chem* **23**: 95~99, 1977
- 25) Foti AG, Cooper JF, Hershman H, Malvaez RR: Detection of prostatic cancer by solid-phase radioimmunoassay of serum prostatic acid phosphatase. *New Engl J Med* **297**: 1398~1399, 1977
- 26) Murphy GP, Chu TM, Karr JP: Prostatic acid phosphatase—The developing experience. *Clin Biochem* **12**: 226~227, 1979
- 27) Bruce AW, Mahan DE, Belville WD: The role of the radioimmunoassay for prostatic acid phosphatase in prostatic carcinoma. *Urol Clin N Am* **7**: 645~652, 1980
- 28) Kuriyama M, Wang MC, Papsidero LD, Killian CS, Shimano T, Valenzuela L, Nishimura T, Murphy GP, Chu TM: Quantitation of prostate-pecific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. *Cancer Res* **40**: 4568~5622, 1980

(1981年8月13日迅速掲載受付)